

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-289884

(43)Date of publication of application : 14.10.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 5/00

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/10

C12N 9/10

C12P 19/18

(21)Application number : 2003-024352

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 31.01.2003

(72)Inventor : IIDA SHIGERU

MORITA HIROMASA

HOSHINO ATSUSHI

ONO EIICHIRO

(30)Priority

Priority number : 2002024574

Priority date : 31.01.2002

Priority country : JP

(54) GENE ENCODING NEW PROTEIN HAVING TRANSGLYCOSYLATION ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a gene encoding a new protein having an activity of transferring glucose to a sugar moiety at the 3-position of a flavonoid, and a method for using the same.

SOLUTION: The gene is derived from, e.g. a morning glory, has a specific amino acid sequence and encodes the protein transferring the glucose to the sugar moiety at the 3-position of anthocyanin. A protein encoded with the gene is provided. A plant in which the gene is transduced produces a flower, or the like, having a color different from that of a natural plant by expression of the gene.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

04.01.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-289884

(P2003-289884A)

(43) 公開日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/10	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-24352 (P2003-24352)

(22) 出願日 平成15年1月31日 (2003. 1. 31)

(31) 優先権主張番号 特願2002-24574 (P2002-24574)

(32) 優先日 平成14年1月31日 (2002. 1. 31)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72) 発明者 飯田 滋

愛知県岡崎市竜美南2-4-1-3-21

(72) 発明者 森田 裕将

愛知県岡崎市竜美北2-3-4 鶴田ハイ
ツ3-B

(72) 発明者 星野 敦

愛知県岡崎市竜美南2-2-1-8-33

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規糖転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子及びその使用方法の提供。

【解決手段】 例えば、アサガオに由来する、特定のアミノ酸配列を有する、アントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する蛋白質をコードする遺伝子、及びこの遺伝子によりコードされる蛋白質が提供される。この遺伝子が導入された植物は、この遺伝子の発現により、天然植物とは異なる色を有する花などをもたらす。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 フラボノイドがアントシアニンである請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項4】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項5】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して30%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項6】 配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項7】 配列番号：1又は配列番号：13に記載の塩基配列の全部または一部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1または2に記載の遺伝子。

【請求項8】 フラボノイドの3位の糖がグルコースである請求項1〜7のいずれか1項に記載の遺伝子。

【請求項9】 請求項1〜8のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

【請求項10】 請求項9に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項11】 請求項1〜8のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

【請求項12】 請求項1〜9のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織もしくは器官。

【請求項13】 請求項12に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花。

【請求項14】 請求項1〜8のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてフラボノイドの3位を修飾する方法。

【請求項15】 請求項1〜8のいずれか1項に記載の遺伝子を用いる花色の調節方法。

【請求項16】 請求項10に記載の宿主を培養し、又はは育させ、そして該宿主からフラボノイドの3位の糖

にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法。

【請求項17】 3位に糖を有するフラボノイドに、請求項11に記載の蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はフラボノイドを配糖化する酵素遺伝子及びその利用方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】花卉産業においては顕花植物の新規なあるいは多様に富んだ新品種の開発が重要である。なかでも、花の色は花卉のもっとも重要な性質である。交配に頼った従来の育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、交配可能な植物種の遺伝資源が限定されているため、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれである。

【0003】花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は主としてその構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関して研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Holton et al. (1995) Plant Cell, 7, p.107 1、Tanaka et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39, p119)。

【0004】アントシアニンの生合成はアントシアニン3-グルコシドに至るまではほとんどの顕花植物で共通である。アントシアニン3-グルコシドは種・品種に特異的な多様な修飾を受ける。この多様性が花色の多彩さの一因となっている。アントシアニンは中性溶液中では不安定な化合物であるが、糖やアシル基により修飾されることにより安定性が向上する。また、これら修飾がアントシアニンの溶解度に影響する。

【0005】また、これら修飾がアントシアニンの細胞内での分布、液胞内での分布にも影響し、結果として花色に影響する (Markham et al. Phytochem. 55, p327-336. (2000), Markham et al. Phytochem. 58, p403-413. (2001), Raymond Brouillard and Olivier Dangles. Flavonoids and Flower colour, p565-588. in The Flavonoids. J. B. Harborne (ED)). アシル基は、アントシアニン骨格に直接結合するのではなく、その糖に結合するため、アントシアニンをアシル化するためには、アントシアニンが配糖化されている必要がある。

【0006】フラボノイドの配糖化に関してはいくつかの報告がある。アントシアニンの3位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、キン

ギョソウ、リンドウ、バラ、オオムギ、トウモロコシなどからクロン化されている (Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119)。また、アントシアニジンの3位の水酸基にガラクトースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子はケツルアズキ (*Vigna mungo*) とベチュニアからクロン化されている (Mato et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1145; Miller et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 273, p34011)。

【0007】さらに、アントシアニジンの5位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、シソ、パーベナ、トレニアなどからクロン化されている (WO 99/05287公報)。アントシアニン3-グルコシドの3位のグルコースの6位の水酸基にラムノースを転移する反応を触媒する酵素 (UDP-ラムノース: アントシアニン3-グルコシド ラムノシルトランスフェラーゼ) の遺伝子はベチュニアからクロン化されている (B rugliera et al. (1994) *Plant J.* 5, p81)。

【0008】フラボノイドの7位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子は、オウゴンからクロン化されており、これを大腸菌で発現させた蛋白質はフラボノイドの7位にグルコースを転移する反応を触媒することが報告されている (Hirofani et al. (2000) *Planta* 210, p1006)。ペタニジンの5位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒する酵素の遺伝子がリビングストンデージからクロン化されており、これを大腸菌で発現させた蛋白質はフラボノイドの4' 位と7位の水酸基にグルコースを転移する反応を触媒することが示された (Vogt et al. (1999) *Plant J.* 19:509-519)。

【0009】また、アラビドプシスのゲノム配列が解明されたことにより、植物ゲノム中には多数の糖転移酵素遺伝子が存在することも明らかとなった (*J Biol Chem* 2001276 p4344)。また、糖転移酵素のアミノ酸配列は、程度は異なるが、相同性があり、スーパーファミリーを形成していること、同じ機能を持つ糖転移酵素のアミノ酸配列は植物種が異なっても相同性が高くスーパーファミリーの中でファミリーを形成していること、一つのファミリーの中で異なる植物種由来の糖転移酵素のアミノ酸配列の同一性は30~50%以上であることが示されている (*J Biol Chem* 2001 276 p4344, *Planta* 200 1 213 p164)。

【0010】アントシアニン3-グルコシドの糖に、グルコースを転移する酵素の活性が確認されたことはある (Forkmann (1999) *Comprehensive natural products chemistry* Vol 1. p. 713-748, Ed. Sankawa, Pergamon) が、酵素が精製されたこともないし、遺伝子がクロン化されたことはない。アサガオ (*pomea nil*) は日本において育種され、多種多様な変種が得られている。また、その連鎖地図も作成されており、花色や形態形成に関する遺伝子座が同定されている。そのうち、いくつ

かの遺伝子、たとえば、カルコン合成酵素、フラバノン3-水酸化酵素、ジヒドロフラボノール4-還元酵素等の遺伝子がクロン化されている (*Annual. New York Acad. Sci.* 1999, 870, p265)。

【0011】アサガオ花卉に含まれる主なアントシアニンはヘンリーブルー-アントシアニンと呼ばれる複雑に修飾されたアントシアニンであるペオニン3-[2-[6-(3-グルコシルカフェイル) グルコシル]-6]-4-[6-(3-グルコシルカフェイル) グルコシル]カフェイル グルコシド]-5-グルコシド (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 199 1, 30, 17) で、その構造からアントシアニン3-グルコシドの糖に、グルコースを転移する酵素が存在することは示唆されるが、その酵素活性が確認されたり、酵素が単離されたり、遺伝子がクロン化されたこともない。

【0012】

【特許文献1】WO 99/05287公報

【0013】

【非特許文献1】Holton et al. (1995) *Plant Cell*, 7, p. 1071

20 【非特許文献2】Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119

【非特許文献3】Markham et al. *Phytochem.* 55, p327-336. (2000)

【非特許文献4】Markham et al. *Phytochem.* 58, p403-413. (2001)

【非特許文献5】Raymond Brouillard and Olivier Dangles. *Flavonoids and Flowercolour*, p565-588. In *The Flavonoids*, J. B. Harborne (Ed)

30 【非特許文献6】Tanaka et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1119

【0014】

【非特許文献7】Mato et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, p1145

【非特許文献8】Miller et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 273, p34011

【非特許文献9】Brugliera et al. (1994) *Plant J.* 5, p81

40 【非特許文献10】Hirofani et al. (2000) *Planta* 210, p1006

【非特許文献11】Vogt et al. (1999) *Plant J.* 19:509-519

【非特許文献12】*J Biol Chem* 2001 276 p4344

【0015】

【非特許文献13】*Planta* 2001 213 p164

【非特許文献14】Forkmann (1999) *Comprehensive natural products chemistry* Vol 1. p. 713-748, Ed. Sankawa, Pergamon

【非特許文献15】*Annual. New York Acad. Sci.* 199 9, 870, p265

【非特許文献16】Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 17

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、およびその用途、特に花色の調節方法を提供しようとするものである。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々研究した結果、アサガオのフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のクローニングに成功し、さらにこの遺伝子を植物に導入し、植物中で発現させる事に成功した。従って本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。好ましくは、フラボノイドはアントシアニンである。

【0018】また、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列を有するフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

【0019】更に、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して30%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；更に、本発明は、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部に対して、5x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；或いは、配列番号：1又は配列番号：13に記載の塩基配列の全部または一部に対して、5x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズにより得られ、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

【0020】本発明はまた、前記何れかの遺伝子を含んだベクター、例えば発現ベクター又は遺伝子移行用（トランスファー）ベクター；及び該ベクターにより形質転換された宿主、例えば微生物宿主、またはトランスジェニック植物を提供する。本発明は更に、上記何れかの遺伝子が導入された植物と同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織もしくは器官、例えば切り花を提供する。

【0021】本発明は更に、上記何れかに記載の遺伝子によってコードされる蛋白質、或いは上記の形質転換さ

れた宿主、例えば微生物宿主又はトランスジェニック植物により生産される蛋白質を提供する。本発明は、又、上記何れかの遺伝子を用いてフラボノイドの3位を修飾する方法を提供する。本発明はまた、上記何れかの遺伝子を用いる花色の調節方法、さらに、本発明は前記宿主を培養し、又は生育させ、そして該宿主からフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。また、本発明は、3位に糖を有するフラボノイドに、前記蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法を提供する。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明の遺伝子としては、例えば配列表の配列番号：2又は配列番号：14に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／又は他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／又は他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。複数個のアミノ酸とは、例えば数個のアミノ酸である。

【0023】本発明はまた、配列番号：2又は配列番号：14に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部または一部、例えばコンセンサス領域の6個以上のアミノ酸をコードする塩基配列、より具体的には配列番号：1又は配列番号：13に示す塩基配列の全部又は一部、例えばコンセンサス領域の6個以上のアミノ酸に対応する部分に対して、例えば5xSSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50℃以下の温度が好ましい。

【0024】このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ダイコン、アカギヤベ、キョウ、コンソリダ、カンパニラ、ラクスパー、ニンジン、ロベリア、ヤマノイモ、西洋アサガオ、サツマイモ、チョウマメ、エンドウマメ由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

【0025】また、ナス科に属するペチュニアとナス由

来のフラボノイドの3位の糖転移酵素遺伝子は高い相同性(72%)を示し、種が異なっても同一機能を有するフラボノイド糖転移酵素遺伝子は高い配列同一性を示すことが知られている。本発明はさらに配列番号:2又は配列番号:14に記載のアミノ酸配列に対して約30%以上、好ましくは約50%以上、より好ましくは約60%または約70%以上、さらに好ましくは約90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子花色変換への利用に関するものである。

【0026】生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAは生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発PCR法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したcDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型として、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

【0027】あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

【0028】また、得られた遺伝子を大腸菌および酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発現させることにより、遺伝子産物であるフラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号:2又は配列番号:14に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質に対する抗体を用いても、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質を得ることができ、抗体を用いて他の生物からも、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をクローン化することもできる。

【0029】従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア(*Escherichia*)属に属する細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、バシラス(*Bacillus*)属微生物、例えばパン

ルス・スプチリス(*Bacillus subtilis*)など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

【0030】酵母としては、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス(*Aspergillus*)属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、ペニシリウム(*Penicillium*)属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

【0031】本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PHO5プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼプロモーター、trpCプロモーター等が使用される。

【0032】また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アリープロモーター、SV40レイトプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガー等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も常法に従って行うことができる。前記の発現ベクターによって形質転換された宿主を培養、栽培または生育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破砕、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする蛋白質を回収、精製することができる。

【0033】さらに本発明は、3位に糖を有するフラボノイドに、前記蛋白質を作用せしめて3位の糖にグルコースが転移したフラボノイドを製造する方法に関するものである。例えば、得られた遺伝子を発現させた植物、酵母、大腸菌等から、本酵素を取得し、それらにUDP-グルコースとフラボノイド3配糖体を加え、酵素反応を行うことでフラボノイド3位の糖にグルコースが付加されたフラボノイド3-オソフロンドを製造することができる。

【0034】本明細書においてはアサガオ由来の遺伝子について述べているが、本発明はアサガオ由来の本遺伝子のみに限定されるものではなく、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子であれば、いずれの由来でもよい。すなわ

ち本発明の遺伝子の由来としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、フラボノイドの3位の糖にグルコースを転移する活性を有していれば同様に花色変換へ利用できる。さらに本発明は、本発明の遺伝子を導入することによる、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。

【0035】本発明で得られた遺伝子を用いると、アントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する反応を促進したり、あるいはアントシアニンの3位の糖にグルコースを転移する反応を抑制することができ、結果として花の色を調節することができる。この際3位のソフォロースにアシル基を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子と併せて利用することもできる。本発明の遺伝子を、アシル基を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子と併用することにより、本発明の遺伝子により付加された糖にさらにアシル基を転移することができる。アシル基が付加することにより、安定性が向上するので、本発明の遺伝子単独で用いるよりも、より青い花色を有する植物を作出することもできる。

【0036】また、植物に遺伝子を導入し、該遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であり、またアンチセンス法やコ-suppression法などによつて目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミンウ、カラシコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレンア、チュリッブ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ボブラ、パナナ、ユウカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルービン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

【0037】

【実施例】以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)に依った。

【0038】実施例1. アサガオDNA断片の増幅

アサガオ系統KK/ZSK-2 (Inagaki Y., et al. Plant Cell 16, 375-383) のンボからRNAを回収し、プライマーNotI d (T) 18 (5'-AACTGGAAGAATTGGCGGCCGAGGAATTTTTTTTTTTTTTTT-3') (配列番号: 3) をプライマーとして、逆転写反応を行った。逆転写物を鋳型とし、プライマーATC(5'-GA(CT)TT(CT)GGTGGGGIAA-3') (配列番号: 4) とプライマーNotI(5'-AACTGGAAGAATTGGCGGCCGAGGA-3') (配列番号: 5) とをプライマーにてPCR反応を行った。反応は、94℃にて1分間保持した後、94℃にて30秒、55℃にて30秒、72℃にて1分からなるサイクルを30サイクル行い、さらに72℃で1分間保持した。

これにより得られたDNA断片をKAT5とした。その配列を、配列番号: 6に示す。

【0039】実施例2. 遺伝子のスクリーニング

KK/FP-39 (マルバアサガオの系統 (Iida S., et al. Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance, NIAR/STA, Tsukuba, p. 23-40)) からmRNAを抽出し、λZAPIIをベクターとするdirectional cDNAライブラリー作製キット (ストラタジーン社) を用いて製造者の推奨する方法でcDNAライブラリーを作製した。5.0×10⁴のプラークをp⁺でラベルしたKAT5でスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、6×SSC、0.5%のSDS、40%ホルムアミド中で37℃にて15時間行った。その後、3×SSC、0.5%のSDS中で5分間室温にて洗浄し、同じ洗浄液で室温にて15分間洗浄した。

【0040】洗浄液を3×SSC、0.5%のSDSに変更し、37℃で45分間洗浄した後、3×SSC、0.5% SDS 中でさらに60℃で45分間洗浄した。しかしながら、明瞭にプローブにハイブリダイズしたクローンは得ることができなかった。しかしハイブリダイズした12クローンを単離し、DNA塩基配列を決定した。その内の一つのクローンKAT5-1は、ペチュニアの遺伝子座RtにコードされるUDP-ラムノース: アントシアニン3-グルコシドラムノシル転移酵素遺伝子(以下、RT) (Plant J. 1994 5 p69 Plant J. 1994 5 p81) と弱い相同性が見られた。アミノ酸の同一性は37%であった。

【0041】KAT5-1のcDNA部分の塩基配列を配列表の配列番号: 1に示し、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号: 2に示す。アサガオのアントシアニンの構造では、アントシアニラムノシル転移酵素が存在するとは考えられず、本遺伝子の機能を決定するために、鋭意研究を行った。

【0042】実施例3. 実施例2で得られた遺伝子の大腸菌での発現

以下の手順でKAT5-1にコードされる糖転移酵素遺伝子は大腸菌で発現した。KAT5-1を鋳型とし、プライマー 3GGT Nco I (5'-CCCATCTGGGTCTCTCAAGCAACAATTAC-3') (配列番号: 7) とプライマー 2GT 500R (5'-CGGGAAATGGCCG GAGC-3') (配列番号: 8) とをプライマーとし、Taqポリメラーゼ (TaKaRa) を用いて、PCR (反応条件: 94℃にて30秒、60℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとして反応を30回繰り返した後、72℃で7分間保持。) を行った。

【0043】得られた約500bpのDNA断片をNcoIとHaeIIとで消化して得たDNA断片と、KAT5-1をHaeIIとKpnIとで消化して得られた約1200bpのDNA断片と、NcoIとKpnIで消化した大腸菌発現ベクターpQE61 (QIAGEN) とをライゲーションし、得られた大腸菌用発現プラスミドをpQE61KAT5-1とした。

【0044】pQE61KAT5-1を大腸菌JM105株に導入し、この大腸菌を37℃で一晩前培養した後、前培養液の一部

を400mLの本培養液に接種し、27℃でOD₆₀₀ = 0.61になるまで培養した。KAT5-1遺伝子の発現誘導のため、最終濃度0.4mMとなるようにイソプロピルベータチオガラクトシド (IPTG) を加え、さらに27℃で一晩培養した。菌体を集菌し、洗浄後、20mLの破砕用緩衝液 (25mM Tris-HCl (pH7.5), 250mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、そして懸濁液を超音波処理することによって菌体を破壊した。菌体破壊液の上清をKAT5-1粗抽出液として以下で述べる反応に用いた。

【0045】実施例4. KAT5-1遺伝子産物による糖付加活性の確認

20μLの実施例3で得られたKAT5-1粗抽出液、10μLの0.5M リン酸カリウム (pH7.5)、20μLの5mM UDP-グルコース、30μLの蒸留水、及び20μLのデルフィニジン3-グルコシド (1.5 mg/mL) を混合し、30℃にて15分間保持した。その後、1-N-HClを最終濃度0.16Nとなるように添加し、反応を停止した。反応液に90% CH₃CN/1% TFAを50μLに加え高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。HPLCカラムは、Asahipak-ODP-50 (6mm φX250mm、昭和電工)、移動相として、A液 0.5%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液、B液0.5%TFAを含む50%アセトニトリルを用いた。

【0046】溶出は、A液:B液=9:1の混合液からA液:B液=5:5の混合液の直線濃度勾配を20分で行った。流速は、0.6mL/分とした。また、検出は520nmの吸光度を用いた。その結果、基質であるデルフィニジン3-グルコシドのピーク (リテンションタイム: 13.2分) に加え、リテンションタイムが11.7分である新しいピークが検出された。従って、この化合物は、デルフィニジン3-グルコシドに糖が付加されたものであると考えられる。また、基質にシアニジン3-グルコシド (リテンションタイム: 14.1分) を用いた場合においても新たなピーク (リテンションタイム: 12.6分) が得られたことから、KAT5-1遺伝子産物は、デルフィニジンおよびシアニジン3-グルコシドを基質として利用できる糖転移能を持つ酵素であると考えられる。

【0047】実施例5. 植物での発現

KAT5-1遺伝子産物の植物体での機能を明らかにするために、KAT5-1遺伝子を構成的に発現するためのバイナリーベクター (pSPB1002) を構築し、花弁にシアニジン3-グルコシドを含有するペチュニア (品種: バカラレッド、サカタのタネ社) を形質転換し、その結果得られた形質転換体の花弁を用いて色素分析を行った。pSPB1002の作製は以下のように行った。

【0048】バイナリーベクターpBE2113-GUS (Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, p49) をSnaBIで消化し、BamHIリナーを挿入した。生じたプラスミドをSacIで消化し、平滑末端化し、さらにSalIリナーを挿入した。生じたプラスミドをEcoRIとHindIIIで消化し、得られる約2kbのDNA断片をバイナリーベクターpBINPLU

S (van Engelen et al. Plant Mol. Biol. 15, p373) のEcoRI-HindIII部位に挿入し、プラスミドpSPB176を得た。一方、クローンKAT5-1のプラスミドをBamHIとXhoIで消化し、約1.64kbのDNA断片を得た。この断片を、pSPB176のBamHI-SalI部位に挿入し、pSPB1002とした。

【0049】次に、pSPB1002を用いて、リューフィスクを用いるアグロバクテリウム法により、ペチュニア (品種バカラレッド、サカタのタネ社) を形質転換し、約50系統の形質転換個体を得た。形質転換の方法は公知の方法 (Plant J. 1994 5 p81) による。

【0050】得られた個体が形質転換体であることを調べるために、それぞれの形質転換体からゲノミックDNAを抽出し、DNA20μgをBamHIで消化し、電気泳動後、Hybond N+メンブレン (Amersham) にブロッティングを行い、ジギキニンゲン (DIG) で標識したKAT5-1遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。DIGシステムを用いたサザンハイブリダイゼーション法は製造業者 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) が推奨する条件に倣った。その結果、得られた個体が独立した形質転換体であることを確認した。

【0051】次に導入したKAT5-1遺伝子の発現レベルを確認するために定量的RT-PCR解析を行った (Plant J. 1998 13, p475)。独立した形質転換体の花弁から全RNAを抽出した後、この全RNA1μgを鋳型として逆転写を行い、cDNAを得た。cDNA合成は、SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GIBCO BRL) を利用し、合成条件は本システム製造業者が推奨する条件に倣った。

【0052】得られたcDNAを鋳型にして、KAT5-1特異的プライマーであるPn3GGT-F; 5'-atg ggt tct caa gca aca act tac (配列番号: 9) 及びPn3GGT-R; 5'-tat tat cgc cac cga act tca tta (配列番号: 10) を用いて、PCR反応を行った。また、導入遺伝子 (KAT5-1) 発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、比較対象としてペチュニアのグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (Pet GAPDH) 遺伝子を採用し、それを特異的に増幅するプライマーとしてPet GAPDH-F; ggt cgttg gt t gca aga gt (配列番号: 11) 及びPet GAPDH-R; ctg g ttt att cca ttacaa cta (配列番号: 12) を用いた。

【0053】PCR反応としては、94℃4分の熱変性の後に、94℃にて1分、55℃にて1分、及び72℃にて2分の反応を12サイクル行った。PCR産物を、前述のサザンハイブリダイゼーションの際と同様の方法でメンブレンにブロッティングし、DIGラベルのKAT5-1またはPetGAPDHをプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。その結果、独立した形質転換体においてKAT5-1の過剰発現を確認した。

【0054】形質転換体からの花弁約0.5gを、50%アセトニトリル、0.1%TFAで抽出しアントシアニンをHPLCで分析した結果、9.5-47.5% (A520nmにおける全アントシ

アニン量に対する割合)のシアニン 3-ソフォロシド (ポリフェノールラボラトリーズ社)と同じ15.0分に溶出する物質のピークが検出された。なおアントシアニンのHPLC分析条件は以下の通りである。

【0055】カラムはShodex DE-413L (4.6mm*250mm)を用いて、移動相として0.5%TFA含有、アセトニトリル10%から50%のグラジエント15分の後、50%アセトニトリル10分間溶出を行った。また、流速は0.6ml/minで行った。検出は島津photo diode array検出器SPD-M10AVPを用いて250-600nmのスペクトルをとり、A520nmで定量した。また、このシアニン 3-ソフォロシドの量は形質転換体におけるKAT5-1の発現量と正の相関があった。

【0056】HPLCで同定した生成物のピークがシアニン 3-ソフォロシドであることを確認するため、同ピークを分離し、そしてMSによる分析を行った。MSはThermoquest社のLC-Qシステムを用い、ESI、ポジティブモードで測定した。その結果、KAT5-1形質転換体花弁で生成された物質は分子量が611 ($[M]^+$ m/z)であり、シアニン 3-ソフォロシドが生成していることが確認された。以上により、KAT5-1はアントシアニン 3-グルコシドのグルコースに対してグルコースを転移し、アントシアニン 3-ソフォロシドを生成する糖転移酵素をコードする遺伝子であることが示された。

【0057】実施例6. アサガオ蓄由来ライブラリー: KK/ZSK-2 buds cDNA library (Gene 226 (1999) 181-188.) に対してKAT5-1をプローブに実施例2と同様のスクリーニングを行った。その結果、50000プラークあたり約25のポジティブなシグナルが得られ、このうち単離を行ったクローンの中から、もっとも長い5' 非翻訳領域 *

*をもつPNGT1-7の塩基配列の解析を行った。PNGT1-7の塩基配列を配列表の配列番号: 13に示し、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号: 14に示す。

【0058】PNGT1-7にコードされる遺伝子および遺伝子産物はマルバアサガオ由来KAT5-1と比べ、DNAレベルで97%の同一性、アミノ酸レベルで99%の同一性を示し、両者は極めて類似しておりPNGT1-7はKAT5-1同様の機能を有するものと考えられる。また、ノザンハイブリダイゼーションにより野生型系統KK/ZSK-2の蕾みに於いてPNGT1-7mRNAの蓄積を示す結果が得られた。

【0059】さらに、花の色素合成遺伝子群の発現に異常(減少)が見られるアサガオの変異体において、PNGT1-7遺伝子の発現も同様に発現が低下している結果が得られた。従って、PNGT1-7遺伝子は、花の色素合成系に関わる遺伝子と同じ発現制御下にあることが類推され、KAT5-1との相同性からしても、デルフィニイン及びシアニン 3-グルコシドを基質として利用できる糖転移酵素であると考えられる。

20 【0060】

【発明の効果】本発明により、アントシアニン 3-グルコシドにグルコースを転移する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子はじめてクローン化でき、花卉で発現させることができた。本蛋白質を花卉で発現させたり、コプレッション法等を用いて、活性を抑制することにより、アントシアニンの構造と花色を変えたりすることができる。

【0061】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Suntory Limited
<120> Gene encoding a novel protein having transglycosylation activity
<130> 1015025
<160> 12
<210> 1
<211> 1665
<212> DNA
<213> Ipomoea purpurea
<220>
<221> SDS
<222> (31)...(1407)
<223> Nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of a protein having an activity to transfer glucose to sugar at position 3 of flavonoids
<400> 1
cagaagaacta gctagcttgg tataggaagt atg ggt tct caa gca aca act tac      54
Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr
1                               5
cac atg gct atg tat ccc tgg ttt ggt gtc ggc cat ctc acc ggt ttc      102
His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe

```

15	15	20	16
10	15	20	
ttc cgc ctc gcc aac aaa cta gcc ggt aag ggt cat cgc atc tcc ttc			150
Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe			
25	30	35	40
ttg atc ccc aaa aac act caa tcc aag ctt gaa tct ttc aat ctt cac			198
Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His			
45	50	55	
cca cac ctc att tcc ttt gtt ccc atc gtc gtg cca tcc att ccc ggc			246
Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly			
60	65	70	
ctc cct ccc ggc gcc gag acc act tcc gat gtc ccc ttt cct tcc acc			294
Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr			
75	80	85	
cat cta ctc atg gag gct atg gac aaa acc cag aac gac att gag atc			342
His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile			
90	95	100	
atc ctc aaa gat ctc aaa gtg gac gtt gtg ttc tat gat ttt acc cac			390
Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His			
105	110	115	120
tgg cta ccc agc ctg gca cgg aag atc ggg atc aaa tca gta ttc tac			438
Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr			
125	130	135	
agc acc att agt ccg ctc atg cat ggc tac gct tta tcc ccg gag cgg			486
Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg			
140	145	150	
aga gtc gtc ggg aaa cag tta act gaa gcc gac atg atg aaa gct ccg			534
Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro			
155	160	165	
gcc agt ttc ccg gac ccg tct atc aag ctc cat gct cac gag gcg cgg			582
Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg			
170	175	180	
gga ttt act gct agg acg gta atg aag ttc ggc ggc gat ata act ttc			630
Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe			
185	190	195	200
ttt gac cgg atc ttt act cgc gtg agt gaa agt gat ggt ttg gcg tac			678
Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr			
205	210	215	
agt act tgc cgg gag att gaa ggc caa ttc tgc gac tac ata gaa acc			726
Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr			
220	225	230	
cag ttt caa aaa cct gtc cta ctc gcc gcc cca gct tta cca gtc cca			774
Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro			
235	240	245	
tcc aaa tcc acc atg gaa cag aaa tgg tgc gat tgg ctg ggg aaa ttc			822
Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe			
250	255	260	
aag gaa ggc tct gtt ata tac tgc gca ttt ggg agc gaa tgc acc ctg			870
Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu			
265	270	275	280
cgc aag gat aag ttc cag gaa tta ctc tgg ggt tta gag ctc aca gga			918

17	18
Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly	
285	290 295
atg cca ttc ttt gct gcc ctg aaa cca cca ttc gaa acc gag tca gtc	966
Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys Pro Pro Phe Glu Thr Glu Ser Val	
300	305 310
gaa gca gcc atc ccg gag gag ctg aag gag aaa ata caa gga aga ggg	1014
Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly	
315	320 325
atc gta cat gcc gaa tgg gtt caa cag caa ctg ttt ctc cag cac cca	1062
Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro	
330	335 340
tcc gtg ggc tgc ttt gtg agc cac tgc ggg tgg gct tct ctg tca gaa	1110
Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu	
345	350 355
gca ctg gtt aat gat tgc caa atc gtg ctg ttg ccg cag gta gga gat	1158
Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp	
365	370 375
caa att atc aac gca aga atc atg agt gtg agc ctg aaa gtt ggg gtg	1206
Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val	
380	385 390
gag gtg gag aaa ggg gaa gaa gat ggg gtg ttt tca aga gag agt gta	1254
Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val	
395	400 405
tgc aag gca gtg aaa gct gtg atg gat gaa aag agt gag ata ggg aga	1302
Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg	
410	415 420
gaa gta aga ggc aac cat gac aag tta aga ggt ttc ttg atg aat gca	1350
Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys Leu Arg Gly Phe Leu Met Asn Ala	
425	430 435
gat ctg gat tca aag tac atg gac tct ttc aat cag aaa ctg cag gat	1398
Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp	
445	450 455
ctc ctt gga tgaatataat ataataat attaatgggt atcactgccc	1447
Leu Leu Gly	
tgagctagaa tggttttagc tagggttttg gttttcttga aaaaatgcac aataagaagt	1507
gcaagctaata taagagaata tatatatata tatatatata tgcattgcagg tctggtgtgt	1567
ttgagcttga tctgtataat aaaggaattt attatcaat gaaagcaact gatatttagg	1627
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa	1665
<210> 2	
<211> 459	
<212> PRT	
<213> Ipomoea purpurea	
<220>	
<223> An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer	
glucose to sugar at position 3 of flavonoids	
<400> 2	
Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe	
1	5 10 15
Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala	
20	25 30

19

20

Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser
 35 40 45
 Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro
 50 55 60
 Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr
 65 70 75 80
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp
 85 90 95
 Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp
 100 105 110
 Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys
 115 120 125
 Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His
 130 135 140
 Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr
 145 150 155 160
 Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile
 165 170 175
 Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met
 180 185 190
 Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val
 195 200 205
 Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly
 210 215 220
 Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys
 245 250 255
 Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys
 260 265 270
 Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu
 275 280 285
 Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys
 290 295 300
 Pro Pro Phe Glu Thr Glu Ser Val Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln
 325 330 335
 Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His
 340 345 350
 Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile
 355 360 365
 Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met
 370 375 380
 Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp
 385 390 395 400
 Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met
 405 410 415
 Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys
 420 425 430

21

22

Leu Arg Gly Phe Leu Met Asn Ala Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp

435

440

445

Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp Leu Leu Gly

450

455

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer NotId(T)

<400> 3

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt ttttttttt ttttt

45

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer ATC

<400> 4

gaytytggit ggggiaa

17

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer NotI

<400> 5

aactggaaga attcgcggcc gcaggaa

27

<210> 6

<211> 472

<212> DNA

<213> 472

<220>

<223> Nucleotide sequence cloned from Ipomoea nil

<400> 6

gactttgggt gggggaagcc aagactgggt gtcaatatgc tcgataatc atgggtgctt

60

ttcttagacg ccattaatgg agcagtagaa gtgtggatga aattgcctaa gcaagttatg

120

cacacattaa cgcaagaccg ccactttctt gcctatgttt ctgccittcc taaaccaaaag

180

ctttgaatac aatgaattaa acaacgtaac tgggtcattg cggaaaccag ggtggttagg

240

aagctcttat ctggctaag gcacgcgaca ttaattctgt agtcgtggaa tctgattgct

300

tgaatctgtg ttctattttg aattctttta tgtcgtgatt tttctatgt aggtactatt

360

attaagcaat gttgatcaat tgctatggat attagtact ttgtgtcaaa aaaaaaaaaa

420

aaaaaaaaaa aaaaaattct gcgcccgcga attcttccag tt

472

<210> 7

23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> Primer 3GGT NcoI	
<400> 8	
ccccatgggt tctcaagcaa caacttac	28
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> Primer 2GT 500R	
<400> 8	
cgggaactg gccggagc	18
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> Primer Pn3GGT-F	
<400> 9	
atgggttctc aagcaacaac ttac	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> Primer Pn3GGT-R	
<400> 10	
ttatatgcc accgaacttc atta	24
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> Primer Pet Gapdh-F	
<400> 11	
ggtcgtttgg ttgcaagagt	20
<210> 12	

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> Primer Pet Gapdh-R
 <400> 12
 ctggttatcc cattacaact a 21
 <210> 13
 <211> 1603
 <212> DNA
 <213> Ipomoea nil
 <220>
 <221> SDS
 <222> (31)...(1407)
 <223> Nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of a protein h
 aving an activity to transfer glucose to sugar at position 3 of flavonoi
 ds
 <400> 13
 cagaaagcta gctagctagg tataggaagt atg ggt tct caa gca aca act tac 54
 Met Gly Ser Gln Ala Thr Tyr
 1 5
 cac atg gct atg tat ecc tgg ttt ggc gtc ggc cat etc acc ggt ttc 102
 His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe
 10 15 20
 ttc cgc etc gcc aat aaa cta gcc ggt aaa ggt cac cgc atc tcc ttc 150
 Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe
 25 30 35 40
 ttg atc ecc aaa aac act caa tcc aag ctt gaa tct ttc aac ctt cac 198
 Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His
 45 50 55
 cca cac etc att tcc ttt gtt ecc atc gtc gta ccg tcc att ecc ggc 246
 Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly
 60 65 70
 etc cct ecc ggc gcc gag acc act tcc gat gtc ecc ttt cct tcc acc 294
 Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr
 75 80 85
 cat cta etc atg gag gcc atg gac aaa acc cag aac gac att gag atc 342
 His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile
 90 95 100
 atc etc aaa gat etc aaa gtg gat gtt gtg ttc tat gat ttt acc cac 390
 Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His
 105 110 115 120
 tgg cta ecc agc ctg gca cgg aag atc ggg atc aaa tca gta ttc tac 438
 Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr
 125 130 135
 agc acc atc agt ccg etc atg cat ggc tac gct tta tcc ccg gag cgg 486
 Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg
 140 145 150

27	28
aga gtc gtc ggg aaa cag tta act gaa gcc gac atg atg aaa gct ccg	534
Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro	
155 160 165	
gcc agt ttc ccg gac ccg tgg atc aag ctc cat gct cac gag gcg cgg	582
Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg	
170 175 180	
ggg ttt act gct agg acg gta atg aag ttc ggt gcc gat ata act ttc	630
Gly Phe Thr Thr Ala Arg Thr Val Met Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe	
185 190 195 200	
ttt gac cgg att ttc acg gcg gtg agt gaa agt gat ggt ttg gcg tac	678
Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr	
205 210 215	
agt act tgc cgg gag att gaa gcc caa ttc tgt gac tac ata gaa acc	726
Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr	
220 225 230	
cag ttt caa aaa cct gtc cta ctc gcc gcc cca gct tta cca gtc cca	774
Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro	
235 240 245	
tcc aaa tcc acc atg gaa cag aaa tgg tgg gat tgg ctg ggg aaa ttc	822
Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe	
250 255 260	
aag gaa gcc tct gtt ata tac tgc gca ttt ggg agc gaa tgc acc ctg	870
Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu	
265 270 275 280	
cgc aag gat aag ttc cag gaa tta ctc tgg ggt tta gag etc aca gga	918
Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly	
285 290 295	
atg cca ttc ttt gct gcc ctg aaa cca cca ttc gaa gcc gaa tca atc	966
Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Ser Lys Pro Pro Phe Glu Ala Glu Ser Ile	
300 305 310	
gaa gca gcc atc ccc gag gag ctg aag gag aaa ata caa gga aga ggg	1014
Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly	
315 320 325	
atc gta cat gcc gaa tgg gtt caa cag caa ctg ttt etc cag cat cca	1062
Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro	
330 335 340	
tct gtc gcc tgc ttt gtg agc cac tgc ggg tgg gct tca ctg tca gaa	1110
Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu	
345 350 355 360	
gca ctg gta aat gat tgc caa atc gtg ctt ttg ccg cag gta gga gat	1158
Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp	
365 370 375	
caa att atc aac gca aga atc atg agt gtg agc ctg aaa gtt ggg gtg	1206
Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val	
380 385 390	
gag gtg gag aaa ggg gaa gaa gat ggg gtg ttt tca aga gag agt gta	1254
Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val	
395 400 405	
tgc aag gca gtg aaa gct gtg atg gat gaa aag agt gag ata ggg aga	1302
Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg	

29
410 415 420
gaa gta aga ggc aac cat gac aag tta aga ggt ttc ttg ttg aat gca 1350
Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys Leu Arg Gly Phe Leu Leu Asn Ala
425 430 435 440
gat ctg gat tca aag tac atg gac tct ttc aat cag aaa ctg cag gat 1398
Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp
445 450 455
ctc ctt gga tgaatataat ataataataat attaatgggt atcactgcct tgagctagaa 1457
Leu Leu Gly
tggttttagc tagggttttg gttttcttga aaaaatgcat aataagaagt gcaagctaat. 1517
taagagaata tatatatata tatgcatgca ggtgtggtgt gtttgagctt gatctgtaaa 1577
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1603
Ipomoea purpurea
<210> 14
<211> 459
<212> PRT
<213> Ipomoea nil
<220>
<223> An amino acid sequence of a protein having an activity to transfer
glucose to sugar at position 3 of flavonoids
<400> 14
Met Gly Ser Gln Ala Thr Thr Tyr His Met Ala Met Tyr Pro Trp Phe
1 5 10 15
Gly Val Gly His Leu Thr Gly Phe Phe Arg Leu Ala Asn Lys Leu Ala
20 25 30
Gly Lys Gly His Arg Ile Ser Phe Leu Ile Pro Lys Asn Thr Gln Ser
35 40 45
Lys Leu Glu Ser Phe Asn Leu His Pro His Leu Ile Ser Phe Val Pro
50 55 60
Ile Val Val Pro Ser Ile Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ala Glu Thr Thr
65 70 75 80
Ser Asp Val Pro Phe Pro Ser Thr His Leu Leu Met Glu Ala Met Asp
85 90 95
Lys Thr Gln Asn Asp Ile Glu Ile Ile Leu Lys Asp Leu Lys Val Asp
100 105 110
Val Val Phe Tyr Asp Phe Thr His Trp Leu Pro Ser Leu Ala Arg Lys
115 120 125
Ile Gly Ile Lys Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ile Ser Pro Leu Met His
130 135 140
Gly Tyr Ala Leu Ser Pro Glu Arg Arg Val Val Gly Lys Gln Leu Thr
145 150 155 160
Glu Ala Asp Met Met Lys Ala Pro Ala Ser Phe Pro Asp Pro Ser Ile
165 170 175
Lys Leu His Ala His Glu Ala Arg Gly Phe Thr Ala Arg Thr Val Met
180 185 190
Lys Phe Gly Gly Asp Ile Thr Phe Phe Asp Arg Ile Phe Thr Ala Val
195 200 205
Ser Glu Ser Asp Gly Leu Ala Tyr Ser Thr Cys Arg Glu Ile Glu Gly
210 215 220
Gln Phe Cys Asp Tyr Ile Glu Thr Gln Phe Gln Lys Pro Val Leu Leu

31 32

225 230 235 240

Ala Gly Pro Ala Leu Pro Val Pro Ser Lys Ser Thr Met Glu Gln Lys

245 250 255

Trp Ser Asp Trp Leu Gly Lys Phe Lys Glu Gly Ser Val Ile Tyr Cys

260 265 270

Ala Phe Gly Ser Glu Cys Thr Leu Arg Lys Asp Lys Phe Gln Glu Leu

275 280 285

Leu Trp Gly Leu Glu Leu Thr Gly Met Pro Phe Phe Ala Ala Leu Lys

290 295 300

Pro Pro Phe Glu Ala Glu Ser Ile Glu Ala Ala Ile Pro Glu Glu Leu

305 310 315 320

Lys Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Ile Val His Gly Glu Trp Val Gln

325 330 335

Gln Gln Leu Phe Leu Gln His Pro Ser Val Gly Cys Phe Val Ser His

340 345 345

Cys Gly Trp Ala Ser Leu Ser Glu Ala Leu Val Asn Asp Cys Gln Ile

350 355 360

Val Leu Leu Pro Gln Val Gly Asp Gln Ile Ile Asn Ala Arg Ile Met

365 370 375

Ser Val Ser Leu Lys Val Gly Val Glu Val Glu Lys Gly Glu Glu Asp

380 385 390 395

Gly Val Phe Ser Arg Glu Ser Val Cys Lys Ala Val Lys Ala Val Met

400 405 410

Asp Glu Lys Ser Glu Ile Gly Arg Glu Val Arg Gly Asn His Asp Lys

415 420 425

Leu Arg Gly Phe Leu Leu Asn Ala Asp Leu Asp Ser Lys Tyr Met Asp

430 435 440

Ser Phe Asn Gln Lys Leu Gln Asp Leu Leu Gly

445 450

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	シーコード (参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	19/18
	9/10	C 1 2 N	15/00
C 1 2 P	19/18		5/00
			Z N A A
			A

(72) 発明者 小埜 栄一郎
 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号
 サントリー株式会社研究センター内

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB04 AD12 CA17 CB03
CG05
4B024 AA08 BA10 BA79 CA01 DA01
DA02 DA05 DA06 DA11 EA04
GA11 GA17 HA08
4B050 CC03 DD13 EE10 LL10
4B064 AF52 BG00 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CB30 CC24 DA11
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X
AA89Y AB01 AC14 AC20
BA02 CA53